

# Phycomyces blakesleeenanusの形質転換系開発に関する研究

著者	福井 丈
号	642
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16649">http://hdl.handle.net/10097/16649</a>

氏 名(本籍)	福 井 丈 <sup>しょう</sup>
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 6 4 2 号
学位授与年月日	平 成 13 年 1 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> の形質転換系開発に関する 研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 大 瀧 保 教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 高 橋 秀 幸

# 論文内容要旨

## 1. はじめに：

ヒゲカビ(*Phycomyces blakesleeanus*)は接合菌類、ケカビ目に属する糸状菌で、多核体である。ヒゲカビは顕著な $\beta$ -カロチン合成や接合反応を行ない、さらに、菌糸の上に 10 cm 以上にもなる巨大な孢子囊柄を分化し、その孢子囊柄が回転したり、光や重力、気流や温度に敏感に反応して屈性を示すことから、「刺激受容—刺激伝達—応答反応」系を解析する上で最もすぐれたモデル材料の一つとして、これまでも多くの研究に使用されてきた。さらに、これらの諸反応に関して 1,000 株にも及ぶ突然変異体が単離され、最近では分子遺伝学的な解析も行われるようになってきた。しかしながら、このカビの分子遺伝学的な解析にとって最も大きな障害は、他の多くの菌類と同様、形質転換を行うことが難しく、未だにその系が確立されていないことである。本研究では、これまで形質転換のために試みられてきた多くの方法を再検討する一方、その改良や新たな技法の開発、さらにこのカビにおける形質転換の困難性の原因を明らかにすることを試みた。

## 2. 優性形質を示す突然変異体の単離とその解析：

優性形質を有する遺伝子は、形質転換系における選抜遺伝子として役立つことが期待されるが、ヒゲカビにおいては理想的な優性形質を持つ遺伝子は知られていない。本研究では、塩素酸感受性または耐性を有する遺伝子が優性形質を示すことを見出し、その変異体を単離し、形質転換系における選抜遺伝子として資することを試みた。

無機窒素を固定するためのキー・エンザイムである硝酸還元酵素(NR)は、糸状菌ではコウジカビやアカパンカビでその存在が認められている。すなわち、これら NR を有する糸状菌では、 $\text{NO}_3^-$  のアナログである  $\text{ClO}_3^-$  を培地に与えると、NR により  $\text{ClO}_3^-$  が還元されて毒性の強い  $\text{ClO}_2$  が生成され、生長阻害が起こる。一方ヒゲカビにおいては、 $\text{NO}_3^-$  を窒素源として利用できないことなどから、このカビには NR は存在しないと言われてきたが、筆者はヒゲカビ標準野生株(NRRL1555 株)が 200 mM の  $\text{KClO}_3$  に対して感受性を示す事実を見出し(Fig.1)、その結果、このカビには NR と同様、強力な還元作用を行う何らかの機構の存在する可能性があり、したがって塩素酸感受性遺伝子の存在とその耐性突然変異体の存在が予測された。

塩素酸耐性変異体を単離するために、先ずヒゲカビの孢子を突然変異誘発剤であるニトロソグアニジン(NTG)で処理し、200 mM の  $\text{KClO}_3$  を含む培地上に播種し選抜した結果、8 株の塩素酸耐性変異体を単離することができた。これらの変異株の中から代表的な菌株として Y98 株を選び、その詳細な生長解析を行った(Fig. 2)。その結果、親株である感受性株 (S102,ただしニコチン酸要求性) は  $\text{KClO}_3$  の濃度の上昇と共に菌糸の生長が阻害されたが(Fig. 2-C)、Y98 耐性株では 200 mM の  $\text{KClO}_3$  を含む培地上でも厚みのある菌糸の生育が見られた(Fig. 2-F)。対照実験として  $\text{KClO}_3$  の代わりに加えた KCl に対しては、両株間で生長に全く差はなく(Fig. 2-B, -E)、また Y98 を含む全ての単離された耐性株は、300 mM の  $\text{KClO}_3$  に対しても十分に耐性であった。

次に変異体の  $\text{KClO}_3$  に対する用量-応答相関(Dose-Response-Curve)を調べた結果、固形最小培地上での菌糸伸長に 2 つのタイプが存在した。すなわち、 $\text{KClO}_3$  を含まない最少培地上で

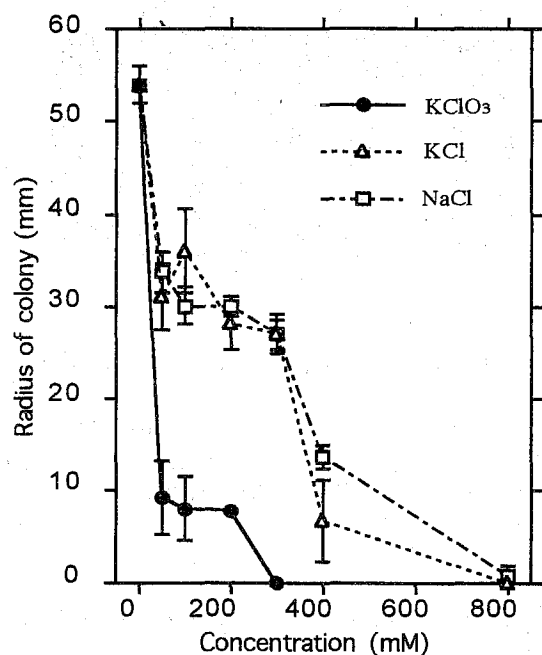


Fig. 1 Effect of various concentrations of potassium chlorate, potassium chloride and sodium chloride on mycelial growth in wild type *Phycomyces blakesleeanus*, NRRL1555.

These chemicals were added to SIV minimal medium. Mycelial front (3 x 3 mm) was inoculated on the edge of the culture dish and the radius of colony was measured after a 5-day culture at 20-22°C. The mean radius with standard deviation for three colonies is expressed in each plot.

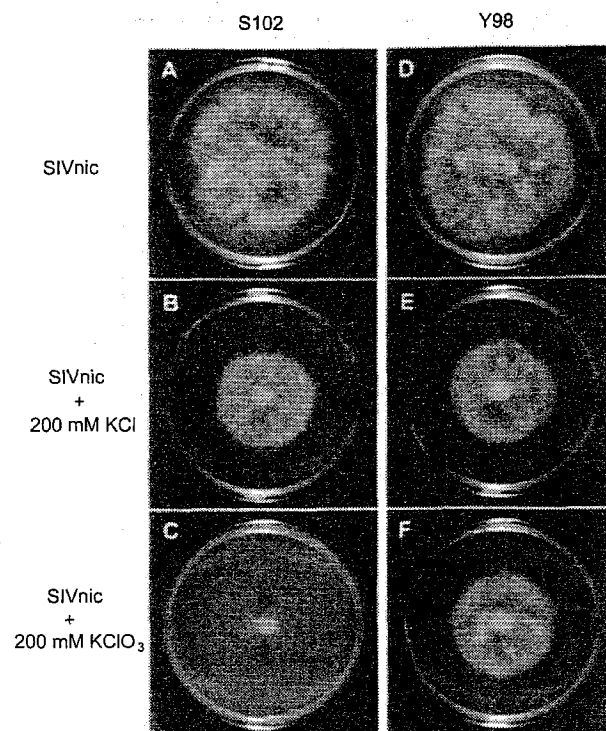


Fig. 2 Growth of the recipient strain S102 and its chlorate resistant mutant Y98.

S102 (A, B and C) and Y98 (D, E and F) were grown for 4 days on SIVnic (A and D), SIVnic+200mM KCl (B and E), and SIVnic+200mM KClO<sub>3</sub> (C and F). Note that although mycelia of S102 elongates by an extent similar to those of Y98 even in the presence of 200 mM KClO<sub>3</sub>, the mycelia show very poor spreading.

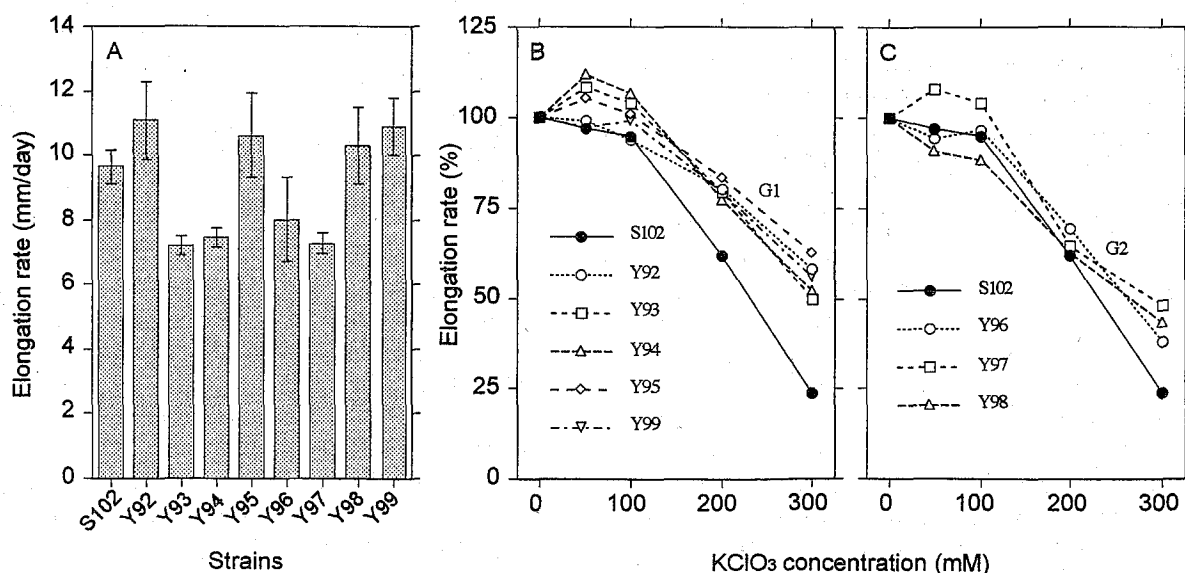


Fig. 3 Growth analysis of chlorate resistant mutants on solid medium.

A. All the 8 mutants and S102 as a control were cultured at 20-22°C on SIVnic medium without chlorate. The mean elongation rates with standard deviation were calculated from 5- to 7-day growth monitoring. B,C. Dose-response curves of potassium chlorate of arbitrary groups divided into two, G1 (B) and G2 (C). Each mean (elongation rate) along a elongation line was normalized to the value without chlorate as 100%. All values are from at least 3 separate experiments.

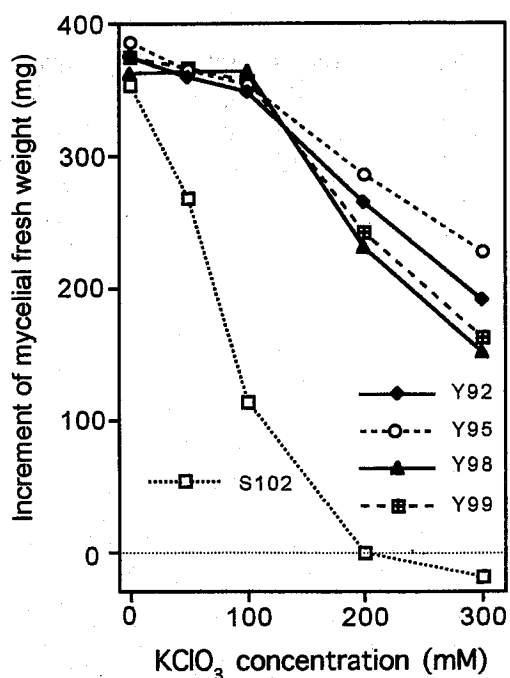


Fig. 4 Growth analysis of chlorate resistant mutants in liquid medium.

Small pieces of mycelia, the weight measured before inoculation, from typical mutant strains were cultured in SIVnic+KClO<sub>3</sub> medium for 4 days. Each value shows the mean from 2 separate experiments.

Table 1 Intracellular concentration of chlorate and sulfate ions as shown by ion chromatography.

Strains	Intracellular concentration (mM) <sup>a)</sup>		
	ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
	+ KClO <sub>3</sub>	- KClO <sub>3</sub>	+ KClO <sub>3</sub>
S102	2.17 ± 0.34	0.71 ± 0.13	0.92 ± 0.2
Y92	1.85 ± 0.21	3.92 ± 0.29	4.52 ± 0.89
Y95	3.59 ± 0.36	2.80 ± 0.18	3.63 ± 0.26
Y98	2.22 ± 0.32	3.39 ± 0.50	3.95 ± 0.54
Y99	3.34 ± 0.68	3.22 ± 0.61	4.38 ± 0.86

<sup>a)</sup> Each figure shows mean±standard deviation from at least 3 separate measurements, carried out after 1 h-exposure to the medium with or without KClO<sub>3</sub>.

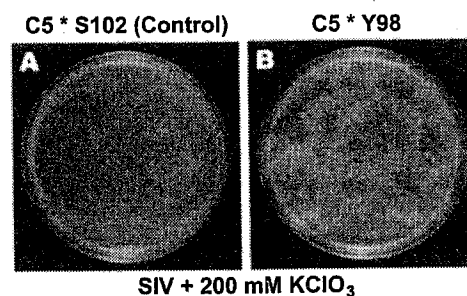


Fig. 5 Phenotypic dominance of chlorate mutants in heterokaryon.

Spores from the heterokaryon C5\*S102 (A) as a negative control and C5\*Y98 (B) were inoculated and cultured for 4 days on SIV+KClO<sub>3</sub> medium.

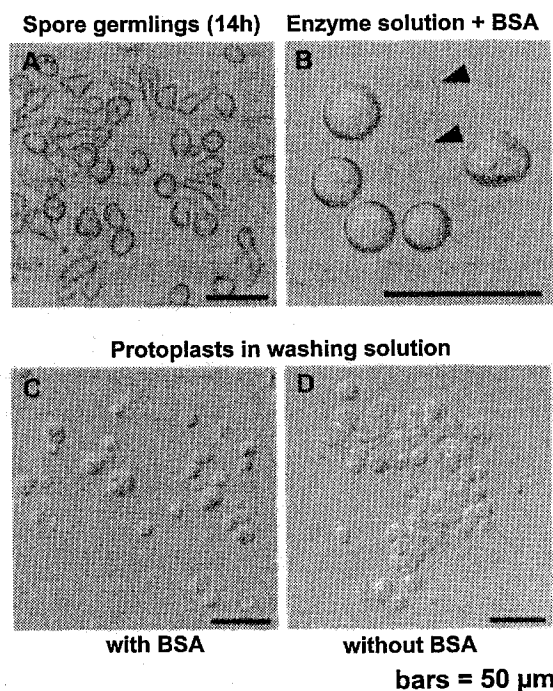


Fig. 6 Effects of BSA on the preparation of protoplasts. A: Spore germlings 14 h after the start of cultivation. B: Protoplasts in a solution of enzymes that contains 0.02% BSA after incubation at 30 °C for 120 min. Arrowheads indicate undigested cell walls derived from spores. C: Protoplasts in washing solution that contains 0.02% BSA. D: An aggregate of protoplasts that had been treated with washing solutions and enzyme solution without BSA.

も耐性株の間で伸長速度に多少差異はあったものの(Fig. 3-A)、それを各々 100%基準にして  $\text{KClO}_3$  を加えた時の伸長速度をみると、200 mM と 300 mM で耐性を示すグループ(Fig. 3-B) と、300 mM で顕著な耐性を示すグループ(Fig. 3-C)がみられた。しかし、液体最小培地中ではこのようなグループの違いは見られなかったが、野生株に比較して変異体の耐性はより強く現れた(Fig. 4)。

次に耐性株と感受性株(この場合白色変異株 C5 を使用)との間で、胞子囊柄を接ぎ木することによって、種々の核比のヘテロカリオンを作成し、それらの耐性に関する相補性(complimentation)を調べた結果、 $\text{KClO}_3$  耐性対立形質は優性であることが明らかとなった(Fig.5)。

また 3 種類の NR 活性(NADPH dependent NR, FADH dependent NR および reduced methyl viologen NR)と塩素酸還元酵素は、塩素酸耐性株と感受性株の両方で欠損していた。さらに、塩素酸イオンの細胞内への取り込みは株間で違いが見られたが、塩素酸耐性機構を説明できる程の差異ではなかった(Table 1)。しかしながら、硫酸イオンの細胞内濃度を測定してみると耐性株では感受性株に比較して 3.5-5.5 倍高くなっていた(Table 1)。この形質が耐性の機構にどのように関与しているかは未だ不明であるが、これらの顕著な形質を有する  $\text{KClO}_3$  耐性遺伝子の存在は明らかであり、ここに遺伝子型 *crw* を設定した。将来この遺伝子がクローン化できれば、ヒゲカビ形質転換系における選抜遺伝子として極めて有望であると期待される。

### 3. 高再生率を有するプロトプラスト作成法の開発：

プロトプラストは外来遺伝子導入には極めて有用である。ヒゲカビの場合、胞子発芽体をキチナーゼおよびキトサナーゼで同時処理することによりプロトプラストが得られることは既に報告されているが、しかし再生率が不十分であったり、また作成されたプロトプラストが互いに接着して大きな凝集塊を形成したり(Fig. 6-D)、あるいはガラスやプラスチック器具に強く接着するなど、プロトプラストを用いた遺伝子導入操作の際の大きな障害となっていた。筆者は、ウシ血清アルブミン(BSA)を添加することによって、このような支障を取り除くことが出来ることを見出した(Fig. 6-B, -C、および Table 2)。このような系を導入することによって、単一のプロトプラストの形成過程(Fig. 7)や再生課程(Fig. 8)を詳細に観察することが出来るようになった。また、この系で調整したプロトプラストの再生率は 40 %以上に達し(Fig. 8)、これまで得られた再生率より約 2 倍高いものであった。これは恐らく、凝集によるプロトプラストの機械的破壊を阻止できたためと考えられる。

プロトプラストの細胞壁の再生過程を、ヒゲカビ菌糸の細胞壁主成分であるキチンのオリゴマーを特異的に認識して結合する小麦胚芽レクチン(succinylated WGA)に蛍光色素を付加して観察した結果、ほとんどのプロトプラストにおいて 60-120 分で細胞壁を新生することが明らかとなった。

一方、プロトプラストの作成に使用される胞子発芽体の細胞壁糖鎖構造を、蛍光標識した種々のレクチンを用いて解析したところ、胞子体の細胞壁はマンノースまたはグルコースが

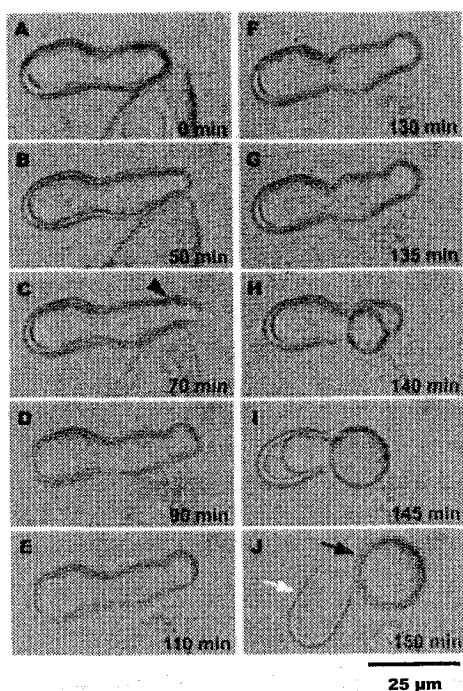


Fig. 7 Time-lapse photomicrographs showing the formation protoplasts.

A, 0 min; B, 50 min; C, 70 min (arrowhead indicates a region of digested cell wall); D, 90 min; E, 110 min; F, 130 min; G, 135 min; H, 140 min; I, 145 min; J, 150 min (black arrow indicates a protoplast, and white arrow indicates the undigested wall of original spore).

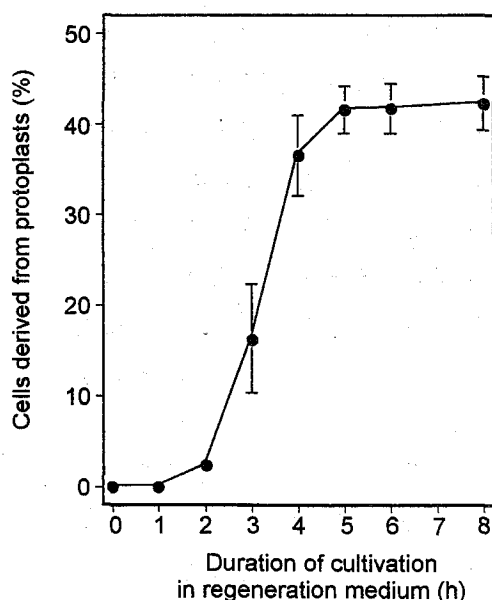


Fig. 8 Time-course of the morphological reversion of protoplasts to hyphae.

Values are means  $\pm$  S.E. of results obtained in 5 replicate experiments with  $2.0 \times 10^6$  protoplasts each case.

Table 2 Effects of BSA on the adhesion of protoplasts to microcentrifuge tubes and on the aggregation of protoplasts.

A

Treatment (WS and SE)	Adhesion of protoplasts to microcentrifuge tube	Aggregation of protoplasts
None	+	+
0.005% (0.05 mg/ml)	+	$\pm$
0.01% (0.1 mg/ml)	$\pm$	-
0.02% (0.2 mg/ml)	$\pm$	-
0.05% (0.5 mg/ml)	$\pm$	-
0.1% (1.0 mg/ml)	$\pm$	-

B

Treatment (0.02% BSA)	Adhesion of protoplasts to microcentrifuge tube	Aggregation of protoplasts
None	+	+
SE	+	$\pm$
WS and SE	$\pm$	-
CM, WS and SE	$\pm$	-

Extent of adhesion or aggregation: +, strong;  $\pm$ , weak; -, none or very weak. Abbreviations: SE, solution of enzymes; WS, washing solution (0.55 M sorbitol); CM, culture medium, namely SIVYC.

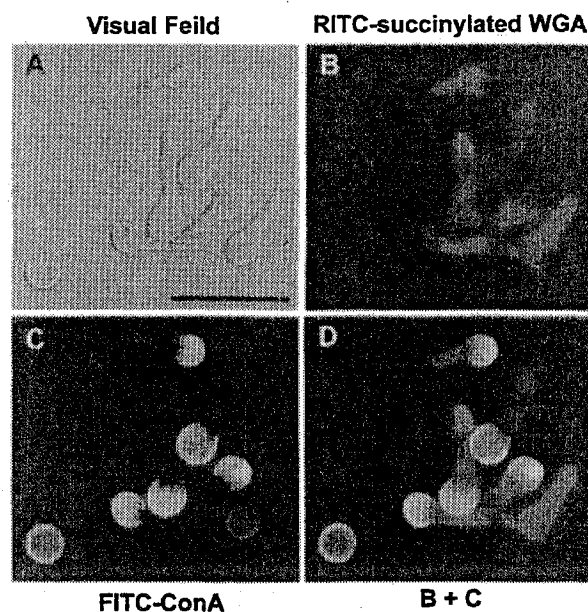


Fig. 9 Detection of saccharide moieties on the cell walls of spore germlings.

A: Photomicrograph under normal illumination. The bar in this figure shows 50  $\mu$ m. B: Fluorescence photomicrograph of spore germlings, showing fluorescence due to RITC-sWGA, in the same visual field as in A. C: Fluorescence photomicrograph of spore germlings, showing fluorescence due to FITC-ConA, in the same visual field as in A. D: Fluorescence photomicrograph of spore germlings, showing fluorescence due to RITC-sWGA (red) and to FITC-ConA (green) in the same visual field as in A.

主成分であったが(Fig. 9-C)、発芽した菌糸、特にその先端部の細胞壁では N-acetyl-D-glucosamine のオリゴマーが主成分であった(Fig. 9-B)。したがって、より効率的にプロトプラストを作成するには、胞子体よりもある程度菌糸の伸長した発芽体をキチナーゼおよびキトサナーゼで同時処理した方が良いことが明らかになった。

以上、胞子発芽体を材料として、また BSA の添加によって凝集のない単一のプロトプラスト集団を効率よく作成することに成功したが、このようにして得られたプロトプラストは高い再生率を有することから、形質転換体を作成する際には極めて有効であると思われる。

#### 4. ヒゲカビへの外来遺伝子の導入：

外来遺伝子をヒゲカビに導入する場合には、(1)使用するヒゲカビの系統株と導入する外来遺伝子、および(2)外来遺伝子を細胞内へ導入する方法を確立する必要がある。前者のヒゲカビに関しては標準野生株(NRRL1555 株)を使用し、導入する外来遺伝子としては抗生物質耐性遺伝子を含むプラスミドベクター(pJL2)を選択した(Fig. 10)。このベクターに含まれるトランスポゾン *Tn903* 由来のカナマイシン耐性遺伝子(*kan*<sup>r</sup>)のプロモーターは非常に広範囲な生物種において活性化されることが知られているため、ヒゲカビにおいても有効であることが予想される。後者の導入法に関しては、プロトプラスト、細胞壁を有する胞子発芽体、胞子嚢形成中の若い胞子嚢柄(stage II-III)を材料として使用し、電気穿孔法、マイクロインジェクション法などによって pJL2 ベクターの導入を試みた。その結果、次の2つの方法によって、形質転換体と思われる抗生物質耐性株を単離することができた。

##### (1)マイクロインジェクション法による胞子嚢への外来遺伝子の導入：

ヒゲカビの胞子嚢柄は直径約 100  $\mu\text{m}$ 、長さ 10 cm にも達し、また強力な再生力を有することから、顕微手術には最適な材料である。いま、胞子嚢形成中の若い胞子嚢柄から、微小なハサミで胞子嚢の部分を切り取り、それを寒天ブロックに載せ、胞子嚢に付いている短い胞子嚢柄の切り口から胞子嚢内へマイクロインジェクション装置を用いて外来 DNA (pJL2) 溶液を注入した。胞子嚢の幾つかはそのまま成熟して中に胞子を形成するが、その胞子をカナマイシンのアナログである G418 (250  $\mu\text{g/ml}$ )を含む選抜培地上に播き、ベクター DNA を取り込んだ形質転換体、すなわち抗生物質耐性株の検出を試みた。その結果、合計 275 個体の抗生物質耐性株が出現した(Fig. 11, Table 3)。

次に、これら G418 耐性株の菌糸の先端部分を切り取り、新たな選抜培地上へ植え継ぐ(subculture)ことによって、最終的に 15 回の植え継ぎの後も安定して耐性を示した 10 株を単離した。これら 10 株の中から、さらに抗生物質を含まない培地では生長速度が標準野生株(NRRL1555 株)の生長速度と差のない耐性株を 5 株選び、種々の特性を検定した。このように菌糸の植え継ぎによって多くの耐性株で生長が停止したが、これをさらに詳しく調べるために、これら 5 株の中から最も顕著な G418 耐性を発現した 1 株について、植え継ぎによって G418 耐性がどのような割合で減少していくかを調べた。すなわち、植え継ぐ度に新たに



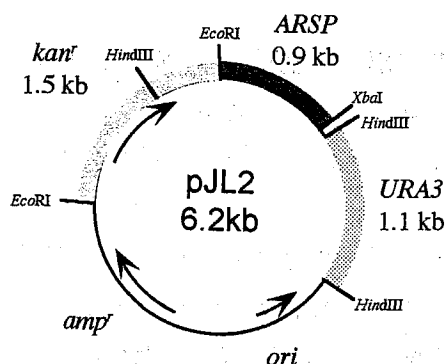


Fig. 10 Restriction map of plasmid pJL2 (Revuelta and Jayaram, 1986).

The ARSP is the *Phycomyces* DNA insert, the URA3 is yeast gene and the *kanr* is kanamycin resistant gene derived from the transposon *Tn903*. The rest of the circle is the vector pUC19.

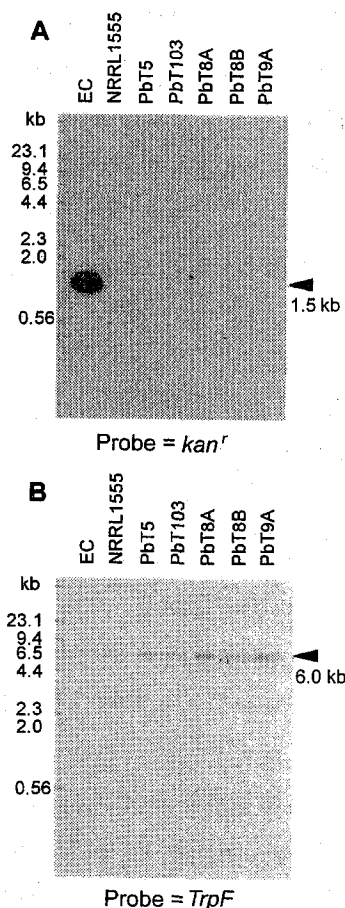


Fig. 12 Detection of kanamycin resistant gene: The DNAs of *E. coli* and *Phycomyces* were electrophoresed in 0.8% agarose gel and assayed by Southern hybridization analysis.

The probe DNAs were prepared from *kanr* and *TrpF* (control) gene fragments. EC, pJL2 (positive control; 0.05 ng); NRRL1555, negative control (10  $\mu$ g); and five strains of kanamycin resistant transformants, PbT5, PbT103, PbT8A, PbT8B and PbT9B (each 10  $\mu$ g).

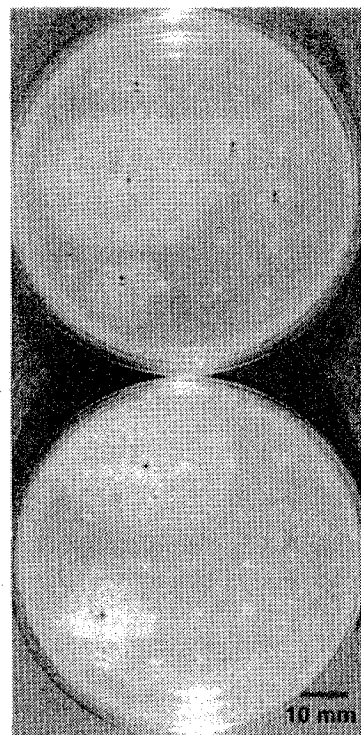


Fig. 11 Development of G418 resistant colonies on selection medium.

The candidates of transformants which were 18 h old mycelia from the spores prepared with microinjection method were transferred independently onto selection medium containing G418 (250  $\mu$ g/ml) and cultured at 20  $^{\circ}$ C for 5 days. The + signs show G418-resistant colonies and the  $\pm$  signs show weak G418-resistant colonies.

Table 3 The number of G418-resistant colonies derived from the spores of plasmid DNA-injected sporangia.

Concentration of pJL2 (ng/sporangium)	No. of G418-resistant colonies			
	+	$\pm$	-	Total
0	0 (0.0)	3 (1.0)	297 (99.0)	300
0.36	34 (2.8)	212 (17.7)	945 (79.5)	1200
3.6	91 (7.6)	206 (17.2)	903 (75.3)	1200
36	150 (8.8)	394 (23.2)	1156 (68.0)	1700

diameter of colonies ; + > 25 mm,  $\pm$  10-25 mm, - < 10 mm

Table 4 The number of G418-resistant colonies derived from the spores collected from subsequent subcultured of plasmid DNA-injected *Phycomyces*.

Number of subculture	Number of G418-resistant colonies (%)			
	+	$\pm$	-	Total
1	53 (26.5)	70 (35.0)	77 (38.5)	200
3	106 (26.5)	107 (26.8)	187 (46.8)	400
5	153 (38.3)	109 (27.3)	138 (34.5)	400

diameter of colonies ; + > 25 mm,  $\pm$  10-25 mm, - < 10 mm

生長した菌糸の上に形成された胞子嚢柄から胞子を集め、その含まれる G418 耐性胞子を測定したところ、5 回の植え継ぎの後でも全胞子の約 30 %の胞子が耐性を示した(Table 4)。しかしながらこの事実は、この個体では菌糸の継体培養では耐性形質が安定しているにも拘わらず、胞子から胞子へ世代を越えて培養した場合には、世代を重ねる毎に 1/3 ずつ耐性を失い、数世代で耐性が全く消失してしまうことをも意味している。

次に 5 株の G418 耐性株より全 DNA を抽出し、その一部を大腸菌(HB101 株)に取り込ませるプラスミドレスキュー試験を試みた。その結果、全ての場合においてカナマイシン耐性を示す大腸菌は出現しなかった。これは、G418 耐性株の細胞中には導入されたプラスミドが存在しないこと示唆した。次に G418 耐性株より抽出された DNA に対して、*kan'* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行ったところ、*kan'* 遺伝子の存在を示す特異的なシグナルは認められなかった(Fig. 12-A)。しかし、2 株について *kan'* 遺伝子の発現産物であるアミノグリコシドリン酸転移酵素[APH(3') I]の酵素活性を native なアクリルアミドゲル電気泳動とラジオアイソトープアッセイを用いる方法でより詳しく調べたところ、ポジティブなシグナルが認められたが、その電気泳動的移動度は期待された値を示さなかった。

以上の結果は、胞子形成直前の胞子嚢柄の中に直接外来 DNA をマイクロインジェクションする方法は、形質転換体を得るためには有効な手段である可能性が高いことを示唆する。しかしながら、サザン解析で導入された遺伝子が検出できないという事実は、導入された DNA が急速に脱落した可能性が考えられる。

## (2) 電気穿孔法によるプロトプラストへの外来遺伝子の導入：

前章で述べた BSA 添加方法によって調整されたプロトプラストに、電気パルスによる細胞穿孔法を利用して外部 DNA の導入を試みた。はじめに電気パルスの処理条件の検討を行った。その結果、ヒゲカビでは、 $1.0 \sim 1.2 \times 10^5$  個のプロトプラストを緩衝液(10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.55 M sorbitol, pH 7.5)中に懸濁し、電気パルス発生装置(Gene Pulser; Bio-Rad)とキューベット(0.2 cm gap, 400  $\mu$ l; Bio-Rad)を用いた場合、充電電圧 2.0 kV/cm, 充電容量 25  $\mu$ F, 負荷抵抗 200  $\Omega$  の処理条件が最も適していることが明らかとなった(Table 5)。

次にこの系を用いて、電気穿孔したプロトプラストに pJL2 を導入した。これらのプロトプラストを 4 時間再生させた後、カナマイシンのアナログである G418 (250  $\mu$ g/ml)を含む培地に移し選抜を行ったところ、12 株の耐性株が得られた。これらの株を 0 世代として、その菌糸上に形成された胞子嚢柄から胞子を回収し、新たな選抜培地上へ播種したところ、全ての株で胞子の発芽と菌糸の展開が認められた。特にその中の 2 株は播種 96 時間目には厚く大きなコロニーを形成した。これら 2 株の菌糸を回収し、全 DNA を抽出して *kan'* 遺伝子の検出を試みたところ、PCR では *kan'* 遺伝子の存在を示すシグナルが明瞭に認められた(Fig. 13-A)。しかし残りの 10 系統では、選択培地上で菌糸の展開と耐性の形質は見られたものの、菌糸の密度が極端に低く、DNA を回収することはできなかった。

次に、胞子移植による 3 世代目の株について耐性を調べたところ、全ての 12 株が選抜培

Table 5 Regeneration ratio of protoplasts treated with various ranges of voltage

Road voltage (KV/cm)	Regeneration (%)	No. of cells counted
0	48.3	(381)
1.0	46.7	(306)
1.5	42.6	(326)
2.0	35.8	(307)
2.5	7.6	(644)
5.0	3.1	(261)

The other conditions were described below: pulse generator, Gene Pulser (Bio-Rad); road resistor, 200 ohm; road capacity, 25  $\mu$ F; working distance, 0.2 cm; strain, NRRL1555; number of protoplasts,  $1.2 \times 10^5$  /400  $\mu$ l; electroporation buffer, 10 mM Tris HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.55 M sorbitol, pH7.5; working temperature, 0 °C. After the electroporation, the suspension of protoplasts was incubated at 0 °C for 60 min, then transferred on solid medium (SIVYC) containing 0.3 M sorbitol and incubated at 20 °C for 12 h. To determine the regenerated cells, microscopic observation was carried out.

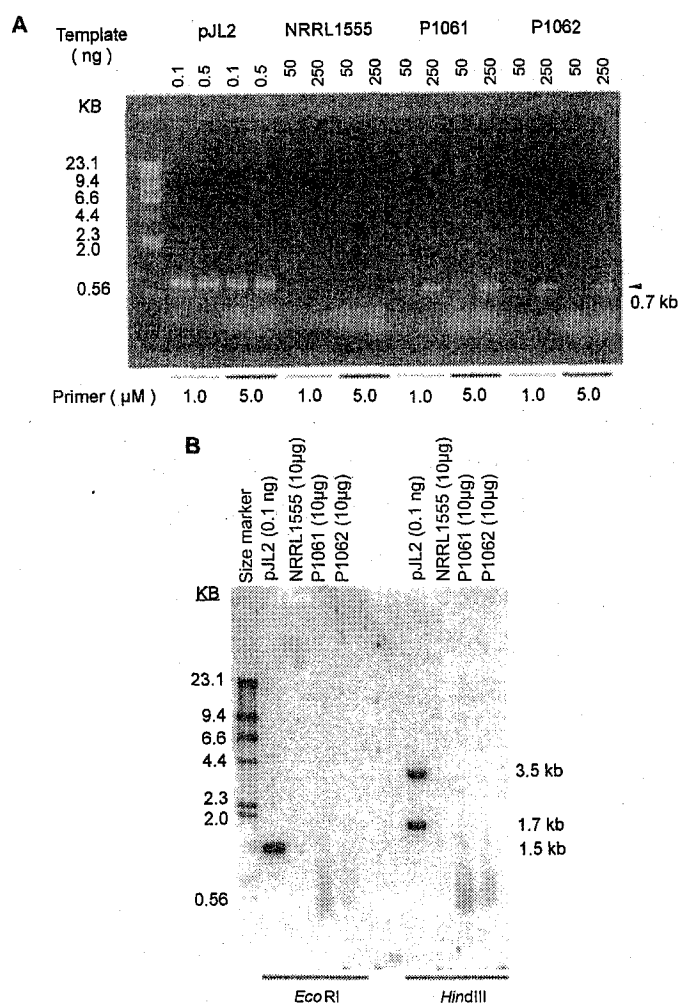


Fig. 13 Detection of *kan<sup>r</sup>* gene from the first generation of G418-resistant *Phycomyces* by PCR method and Southern analysis.

A: Agarose gel electrophoretic patterns of the *kan<sup>r</sup>* gene fragments after the PCR. B: The hybridization patterns of Southern analysis. The probe DNA was prepared from *kan<sup>r</sup>* gene with multi-prime method.

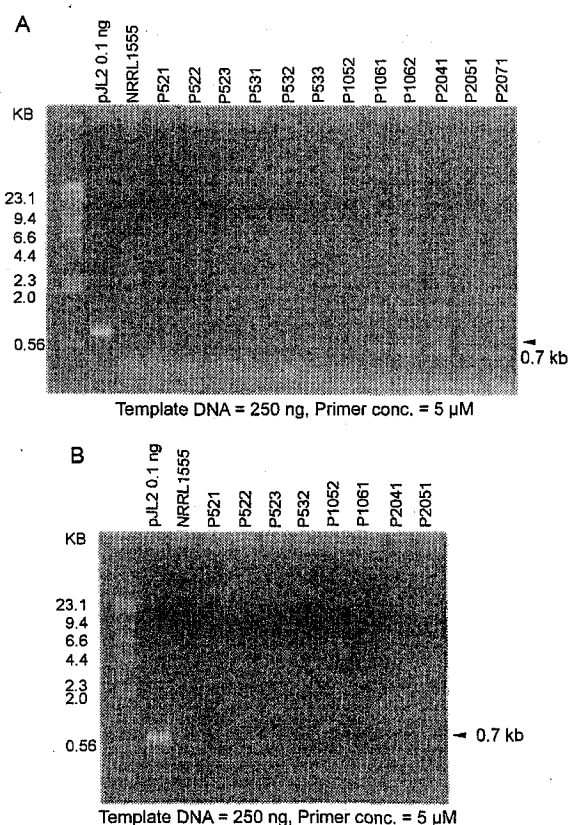


Fig. 14 Detection of *kan<sup>r</sup>* gene from the third and fifth generations of G418-resistant *Phycomyces* by PCR method.

A: the third generation. B: the fifth generation.

地上で十分に生長した。これらの株について胞子播種後 96 時間目の菌糸から DNA を回収し、PCR 法による *kan<sup>r</sup>* 遺伝子の検出を試みたところ、*kan<sup>r</sup>* 遺伝子の存在を示すシグナルが認められた株と検出できない株に分れた(Fig. 14-A)。しかし、このシグナルは 1 世代目のシグナルと比較すると弱く、また複数のシグナルに分かれた。5 世代目では、8 株から胞子播種後 96 時間目に十分に成長した菌糸を回収することができたが、DNA を抽出して同様な方法で *kan<sup>r</sup>* 遺伝子の検出を試みたが、もはや *kan<sup>r</sup>* 遺伝子の存在を示すシグナルは検出できなかった(Fig. 14-B)。この *kan<sup>r</sup>* 遺伝子の検出は *kan<sup>r</sup>* 遺伝子をプローブとしたサザン解析によっても検出できなかった。サザン解析では、1 世代目(Fig. 13-B)、3 世代目、5 世代目の全てにおいて、*kan<sup>r</sup>* 遺伝子特異的なシグナルは検出できなかった。

以上の結果は、ヒゲカビで形質転換体を得るには、電気穿孔法によるプロトプラストへの外来 DNA の導入法もまた有効であることを強く示唆する。PCR 法によって、導入された薬剤耐性遺伝子はヒゲカビの世代を経て急速に減少することが明らかになったが、このような導入遺伝子の脱落はマイクロインジェクション法によって得られた形質転換体でも観察されたことと一致した。また、サザン解析によっては導入された遺伝子を検出できなかったが、今回用いた pJL2 は自律複製のための DNA 配列(*ARSP*)を含んでいるが(Fig. 10)、その働きはヒゲカビ細胞内では不十分であった可能性がある。また別の可能性としては、ヒゲカビは隔壁がほとんど存在しない多核細胞であるため、抗生物質耐性遺伝子がサザン解析の検出限界を下回る程度までコピー数が減少していることが考えられる。

##### 5. ヒゲカビ細胞内へ導入された外来遺伝子の衰退の原因究明：

上記の結果はプロトプラスト法またはマイクロインジェクション法によってヒゲカビ細胞内へ導入された外来遺伝子は、継時的に、また世代を越えて急速に脱落する可能性が高いことを強く示唆する。なぜヒゲカビではこのような脱落が急速に生じるのかは、これまで未知であった。その原因を明らかにするため、種々の発生段階にあるヒゲカビから細胞抽出液(CFE)を調整し、これにプラスミド DNA(pJL2)を加え、その時間的な変化を観察した。

すなわち、胞子発芽体(播種後 16 時間目)、菌糸-1 (播種後 36 時間目)、菌糸-2 (播種後 48 時間目)、stage I 胞子嚢柄(播種後 72 時間目)および stage II-III 胞子嚢(播種後 72 時間目)から、同じ量のタンパク質( $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )を含むように調整した CFE に、 $1 \mu\text{g}$  の pJL2 を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間処理し、その後 pJL2 がどのような変化を受けたかをアガロースゲル電気泳動により検定した。その結果、胞子発芽体と生長期の菌糸-1 の CFE では、pJL2 は CCC フォーム(4.0 kb)が OC フォーム(6.2 kb)となる変性を受けたが、DNA の断片化は認められなかった(Fig. 15-A, lane 2, 3 and 4, 5)。一方、成熟した菌糸-2、胞子嚢柄、胞子嚢の CFE では、pJL2 はほとんど完全に分解されたと思われる像が得られた(Fig. 15-A, lane 6, 7, lane 8, 9, lane 10, 11)。また菌糸-2 の CFE では、pJL2 は 2 時間後には PCR 法でも検出されないレベルまで完全に分解されることが明らかとなった(Fig. 15-B, lane 5)。

次に対照実験として、既に形質転換系が確立している糸状菌であるアカバンカビ

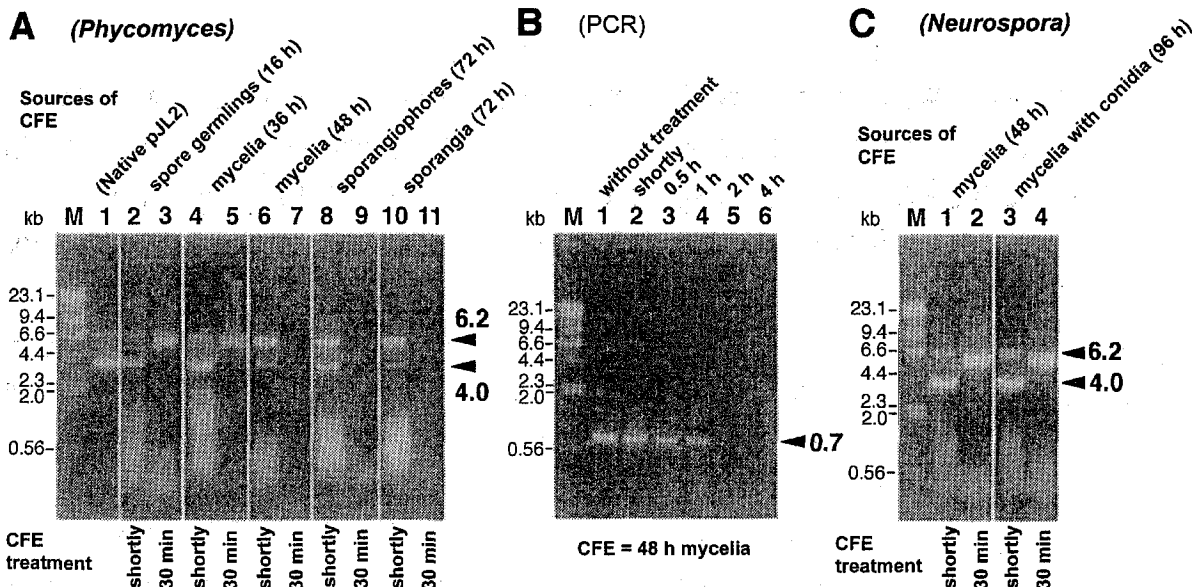


Fig. 15 Detection of nucleolytic activities.

A: Detection of nucleolytic activities in CFEs prepared at various developmental stages. Lane 1 shows 0.25  $\mu$ g of pJL2 (negative control). pJL2 treated for a few seconds (lanes 2, 4, 6, 8 and 10) or 30 min (lanes 3, 5, 7, 9 and 11) with CFE prepared from 16 h-spore germlings (lanes 2 and 3), 36 h-mycelia (lanes 4 and 5), 48 h-mycelia (lanes 6 and 7), stage I-sporangiophores (lanes 8 and 9) and stage II - III-sporangia (lanes 10 and 11) was visualized with ethidium bromide. Smear signals represent RNA in CFE (lanes 2, 4, 6, 8 and 10). B: Detection by PCR of pJL2 treated with CFE prepared from mycelia harvested 48 h after the start of cultivation. Lane 1 shows PCR-amplified product of pJL2 without treatment with CFE (positive control). PCR-amplified product of pJL2 that had been treated with CFE for a few seconds (lane 2), 30 min (lane 3), 60 min (lane 4), 120 min (lane 5), and 240 min (lane 6) was visualized with ethidium bromide. C: Detection of nucleolytic activity in NcCFEs prepared from cells at two different stages. pJL2 treated for a few seconds (lanes 1 and 3) or 30 min (lanes 2 and 4) with NcCFE prepared from 48 h-mycelia (lanes 1 and 2) and 96 h-mycelia including conidiophores and conidia (lanes 3 and 4) is visualized with ethidium bromide. Smear signals represent RNA in NcCFEs (lanes 1 and 3). Lane M shows DNA size markers (0.5  $\mu$ g of *Hind*III-digested  $\lambda$ DNA).

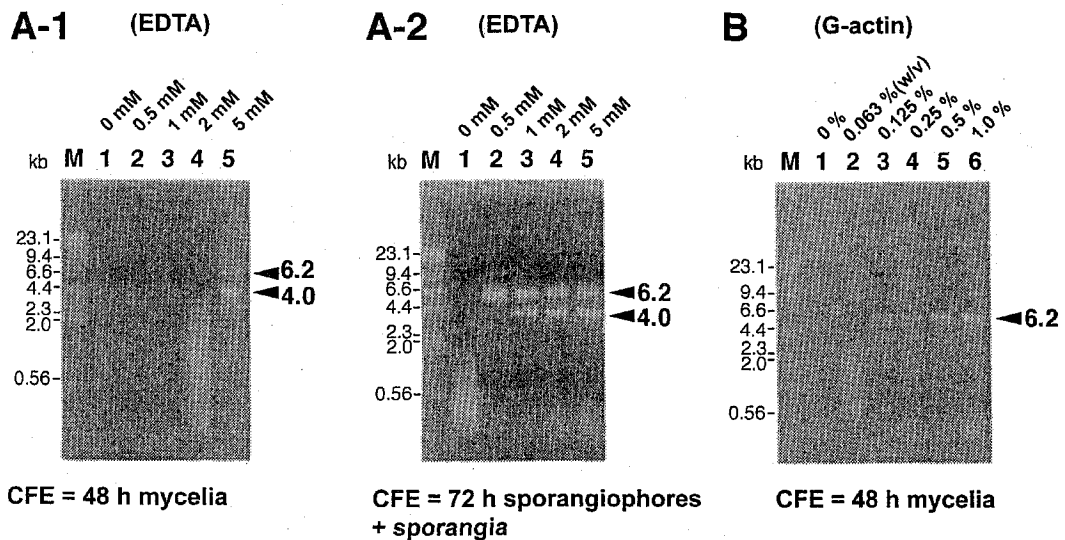


Fig. 16 Inhibition of nucleolytic activities.

A-1: Inhibition by EDTA of nucleolytic activities in CFE prepared from mycelia collected 48 h after the start of cultivation. pJL2 treated with CFE for 30 min without EDTA (lane 1) and with 0.5 mM (lane 2), 1 mM (lane 3), 2 mM (lane 4) and 5 mM (lane 5) of EDTA was visualized with ethidium bromide. A-2: Inhibition by EDTA of nucleolytic activity in CFE prepared from a mixture of sporangiophores at stage I and sporangia at stage II - III, collected 72 h after the start of cultivation. pJL2 treated with CFE for 30 min without EDTA (lane 1) and with 0.5 mM (lane 2), 1 mM (lane 3), 2 mM (lane 4) and 5 mM (lane 5) of EDTA was visualized with ethidium bromide. B: Inhibition by G-actin of nucleolytic activity in the same CFE as in A-1. pJL2 treated with CFE for 30 min without G-actin (lane 1) and with 0.063% (w/v) (lane 2), 0.125% (lane 3), 0.25% (lane 4), 0.5% (lane 5), and 1% (lane 6) of G-actin was visualized with ethidium bromide. Lane M shows DNA size markers (0.5  $\mu$ g of *Hind*III-digested  $\lambda$ DNA).

(*Neurospora*)の野生株について、同様な実験を行った。すなわち、アカパンカビの分生子播種後48時間目の生長期の菌糸と、播種後96時間目の分生子を多数形成した成熟菌糸からCFEを調整し、同様な条件でpJL2を処理したところ、いずれのCFEにおいてもpJL2はCCCフォーム(4.0 kb)からOCフォーム(6.2 kb)へと変性したが、DNAの断片化は認められなかった(Fig. 15-C, lane 1, 2, lane 3, 4)。

以上の結果から、若い時期のヒゲカビのCFEではCCCフォームのプラスミドをOCフォームと変性させる一本鎖ヌクレアーゼの活性が認められ、またこの活性はアカパンカビのCFEでも認められた。一方、成熟したヒゲカビCFEには強力な二本鎖エキソヌクレアーゼ活性が認められた。この場合、アカパンカビのCFEではトリプシン処理で初めて活性化される二本鎖エキソヌクレアーゼの存在が知られているが、ヒゲカビにおいては何らの処理も行っていないCFEにおいても二本鎖エキソヌクレアーゼが存在したことになる。ヒゲカビでは、このエキソヌクレアーゼ活性は発生段階に特異的、すなわち、その活性は生長期では顕著ではなく、成熟期以降に急激に増加するものと思われる。

次に、このヌクレアーゼが実際に外来DNAの脱落に関与していることを証明するために、二本鎖ヌクレアーゼの活性に対する阻害剤の効果を調べた。その結果、菌糸-2と(孢子囊柄+孢子囊)のCFEのヌクレアーゼ活性は、EDTA (Fig. 16-A-1, A-2)及びG-actin (Fig. 16-B)によって阻害されることが明らかとなった。したがってこのヌクレアーゼ活性はDNaseによるものであり、G-actinが特に有効であったことからDNase Iである可能性が高い。

以上の結果から、ヒゲカビにおいて細胞質中に導入された外来DNAが経時的および継代的に脱落する要因の一つとして、DNase Iが関与している可能性が高く、逆に言えば、G-actinを外来DNAを導入する際に添加することによって、外来DNAを保護できる可能性を示唆する。すなわち、本研究で単離された薬剤耐性株では、はじめは導入された外来遺伝子の発現によって薬剤耐性を獲得するが、時間の経過と共に細胞内のDNase I活性によって遺伝子が分解され、次第に遺伝学的に耐性機能を失っていく。しかし、おそらくは一旦獲得した形質と、繰り返し与えられる薬剤ストレスに対して菌体の獲得する馴化作用(acclimation)によって、表現型的に耐性を示すものと考えられる。

## 6. まとめ：

本研究は、これまで多くの研究者によって困難とされてきたヒゲカビにおける形質転換系を確立する上で、有望で、かつ操作の単純な方法を開発し、また形質転換系確立の困難性の原因を指摘した。ヒゲカビは、単細胞性の単純な形態、早い生長、外的刺激に対する鋭敏な応答反応、顕著な形態形成や接合反応など種々興味ある特質を有し、これらの形質に関する多くの突然変異株のコレクションも得られている。したがって、本研究で得られた成果は、ヒゲカビのみならず、同様にそれぞれの特性を有する他の糸状菌の分子遺伝学的な解析にとっても、大きな貢献をするものと期待される。

[発表論文]

- Ootaki T., A. Miyazaki, J. Fukui, Y. Kimura, S. Umemura, R. Okazaki and M. Jayaram (1991) A high efficiency method for introduction of exogenous genes into *Phycomyces blakesleeanus*. Japan. J. Genet. **66**: 189-195.
- Fukui J., A. Miyazaki and T. Ootaki, Isolation and characterization of chlorate resistant mutants from nitrate-nonutilizing fungus *Phycomyces blakesleeanus*. Mycoscience **41** (Accepted)
- Fukui J., K. S. Choi, A. Miyazaki, T. Ootaki and T. Oikawa, Analysis of the formation of protoplasts and regeneration of cells in *Phycomyces blakesleeanus*. J. Microbiol. Biotech. **10** (Accepted)
- Fukui J., K. S. Choi, A. Miyazaki, T. Ootaki and T. Oikawa, Demonstration of stage-specific nucleolytic activity in cell-free extracts of *Phycomyces* and inhibition of this activity by EDTA and G-actin. Mycoscience **42** (Accepted)

[参考論文]

- Horie T., C. Schimek, J. Fukui, A. Miyazaki, H. Mihara, T. Tsuru, M. Koseki and T. Ootaki (1998) Developmental stage-dependent response of *Pilobolus crystallinus* sporangiophores to gravitative and centrifuge stimulation., Mycoscience **39**: 463-470.

## 論文審査結果要旨

接合菌類に属し多核体であるヒゲカビは、光や重力などの外的刺激に対して敏感に反応することから、刺激伝達系を研究する上で、すぐれたモデル材料となっている。これら諸反応に関して多くの突然変異体が単離され、最近では分子遺伝学的な解析も行われるようになったが、形質転換系がまだ確立されておらず研究上の大きな障害となっていた。申請者は、これまで試みられてきた形質転換法を再検討する一方、その改良や新たな技法の開発、さらにこのカビにおける形質転換の困難性の原因解明を行った。

申請者はまず、優勢形質を有する遺伝子が形質転換系における選抜遺伝子と成り得ることに注目し、ヒゲカビの胞子をNTGで処理することによって優勢形質を有する塩素酸耐性変異体の単離に成功した。耐性の原因を調べたところ、塩素酸イオンの細胞内への取り込みは正常であったが、硫酸イオンの細胞内濃度は耐性株では感受性株に比較して数倍高いことを見出した。

次に申請者は、外来遺伝子導入には極めて有用なプロトプラスト作成法の改良を行った。従来の方法で得られたプロトプラストは一般に再生率が低く、また互いに接着して凝集塊を形成したり、ガラス壁面に接着するなどの難点があったが、ウシ血清アルブミンを添加することによってこのような難点を取り除くことに成功した。また、再生率も40%以上に上げることができた。

蛍光色素を付加した小麦胚芽レクチンで染色することによって、プロトプラストの細胞壁の再生過程を観察したところ、60-120分で細胞壁を新生することを見いだした。また、胞子発芽体の細胞壁糖鎖構造を蛍光標識した種々のレクチンで染色することによって、胞子体表面の細胞壁主成分はマンノースまたはグルコース、発芽した菌糸の先端部はN-アセチルグルコサミンのオリゴマーが主成分であり、したがって、効率的にプロトプラストを作成するには、胞子体よりもある程度菌糸の伸長した発芽体の方が有利であることを見いだした。

次に申請者は、トランスポゾン*Tn903*由来のカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドベクターを外来遺伝子として、巨大で再生力の強いヒゲカビ胞子嚢柄に顕微手術によって直接注入することによって、カナマイシンのアナログであるG418に対し耐性な形質転換体と思われる胞子を得ることに成功した。さらに、これら耐性は菌糸の植え継ぎや世代を越えた培養によって、次第に消失することを明らかにした。

次に、ヒゲカビで形質転換体を得るには、BSA添加法によって調整されたプロトプラストに電気パルスによる細胞穿孔法も有効であることを、また導入された薬剤耐性遺伝子の動向はPCR法を利用することによってより正確に追求できることを明らかにし、その結果ヒゲカビでは世代を経るにつれて外来遺伝子が急速に減少することを再確認した。

次に申請者は、導入された外来遺伝子が細胞内でなぜ急速に脱落するのか、その原因を明らかにするため、種々の発生段階のヒゲカビから調整した細胞抽出液にプラスミドDNAを加えて、その時間的な変化を観察した。その結果、胞子発芽体の細胞抽出液ではプラスミドはCCCフォームがOCフォームへと変化した。DNAの断片化は認められないこと、また胞子嚢柄や胞子嚢の抽出液ではほとんど完全に分解されることを明らかにした。

さらに、種々の阻害剤の効果を調べることによって、外来遺伝子の脱落にはDNaseによるものであり、特にG-actinが有効であったことからDNaseIを含む可能性が高いことを明らかにした。

以上の結果から、はじめは導入された外来遺伝子の発現によってヒゲカビは薬剤耐性を獲得するが、時間の経過と共に細胞内のDNaseI活性によって遺伝子が分解され、次第に遺伝学的に耐性機能を失っていくものと思われる。しかし、おそらくは一旦獲得した形質と、繰り返し与えられる薬剤ストレスに対して菌体の獲得する馴化作用によって、表現型的に耐性を示すものと考えられた。

この研究は、これまで多くの研究者によって困難とされてきたヒゲカビにおける形質転換系を確立する上で有望な方法を開発し、形質転換系確立の困難性の原因を明らかにした。これはヒゲカビの形質転換系の確立だけでなく、同様な困難性を有する他の糸状菌にとっても、極めて大きな貢献を果たすものと期待される。

よって審査員一同は、この論文の著者に博士（農学）の学位を授与することが適当と判断した。